

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 6 月 23 日 (23.06.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/056072 A1

(51) 国際特許分類: A61L 27/38, C12N 5/06

Yoshimi) [JP/JP]; 〒3001207 茨城県牛久市ひたち野東
111-1-101 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/018339

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 20 号 神谷町 MT
ビル 19 階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2004 年 12 月 2 日 (02.12.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2003-413758

2003 年 12 月 11 日 (11.12.2003) JP
特願 2004-096686 2004 年 3 月 29 日 (29.03.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独
立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE
AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012
埼玉県川口市本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). 独
立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL IN-
STITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE
AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代
田区霞が関一丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP). 独立行政法人
物質・材料研究機構 (NATIONAL INSTITUTE FOR
MATERIALS SCIENCE) [JP/JP]; 〒3050047 茨城県つ
くば市千現一丁目 2 番 1 号 Ibaraki (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

— すべての指定国のための不利にならない開示又は新
規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 木田 尚子
(KIDA, Naoko) [JP/JP]; 〒3050003 茨城県つくば
市桜 2-30-4-211 Ibaraki (JP). 植村 寿公 (UEMURA,
Toshimasa) [JP/JP]; 〒3058566 茨城県つくば市東 1-1-1
中央第 6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki
(JP). 田中 順三 (TANAKA, Junzo) [JP/JP]; 〒3050047
茨城県つくば市千現一丁目 2 番 1 号 独立行政法人物
質・材料研究機構内 Ibaraki (JP). 大藪 淑美 (OYABU,

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する
申立て

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF CONSTRUCTING THREE-DIMENSIONAL CARTILAGE TISSUE BY USING MYELOID CELLS IN PSEUDO-MICROGRAVITY ENVIRONMENT

(54) 発明の名称: 擬微小重力環境下での骨髄細胞を用いた 3 次元軟骨組織構築方法

(57) Abstract: A method of three-dimensionally constructing a cartilage tissue by culturing myeloid cells in a pseudo-microgravity environment which is established by using a bioreactor such as an RWV.

(57) 要約: 本発明は、RWV 等のバイオリアクターによって実現される擬微小重力環境下において骨髄細胞を培養することにより、3 次元に軟骨組織を構築する方法に関する。



WO 2005/056072 A1

明 細 書

擬微小重力環境下での骨髄細胞を用いた 3 次元軟骨組織構築方法

5 技 術 分 野

本発明は、擬微小重力環境下における骨髄細胞を用いた 3 次元軟骨組織構築方法に関する。

背 景 技 術

- 10 近年、整形外科領域では軟骨欠損部位の修復に、患者から採取した自家軟骨より単離した軟骨細胞を、一旦生体外で培養・増殖させてから欠損部位に再移植する技術が活発に研究され、一部では実用に至っている。しかし、軟骨細胞はシャーレのような容器で 2 次元培養すると脱分化して繊維芽細胞になってしまうため、軟骨基質産生能等の軟骨細胞本来の機能を失
- 15 ない、移植しても十分な治療効果が望めないという問題がある。

この問題を解決する手段は 3 次元培養であるが、常に重力の影響を受ける地上では、水より比重が若干大きい細胞は培養液中に沈降してしまうため、結局 2 次元培養しか望めないことになる。そのため、3 次元培養を行うためには、通常適当な足場材料を用いて培養を行うことが必要となる。

- 20 一方、攪拌培養法による 3 次元組織構築へのアプローチもある。しかし、従来の攪拌培養法では、細胞に与えられる機械的刺激や損傷が強く、大きな組織を得ることは困難か、あるいは得られたとしても内部で壊死を起こしていることが多い。

- これに対し、重量を最適化するために設計された一連のバイオリアクターが存在する。その 1 つである RWV (Rotating Wall Vessel) バイオリアクターは、NASA が開発したガス交換機能を備えた回転式バイオリアクターである（例えば、米国特許 5, 0 0 2, 8 9 0 号参照）。RWV バイオリアクターは、横向き円筒形バイオリアクター内に培養液を満たし、細胞を播種した後、その円筒の水平軸方向に沿って回転しながら培養を行う。回転による応力のため、バイオリアクター内は地上の重力に比較して 100 分の 1 程
- 30

度の微小重力環境となる。したがって、細胞は培養液中に均一に懸濁された状態で増殖することが可能となり、凝集して、大きな組織塊を形成できる。

RWV バイオリアクターの他にも、RCCS (Rotary Cell Culture System™:Synthecon Incorporated) や 3D-clinostat など、数種の擬微小重力環境を実現する装置が開発され(例えば、特開平 8-173143 号、特開平 9-37767 号、特開 2002-45173 号参照)、実用に供されている。さらに、こうした擬微小重力環境下での細胞培養の結果も、既に特許や論文として発表されている(例えば、米国特許 5,153,133 号、米国特許 5,155,034 号、米国特許 6,117,674 号、米国特許 6,416,774 号参照)。擬微小重力環境下での軟骨組織構築については、PLGA などの足場材料と軟骨細胞とのコンポジットを作製することにより、軟骨組織を構築する方法が知られている。

一方、軟骨組織再生における自家軟骨の採取は、正常組織に与える侵襲が大きく、その採取量にも限界があるといった問題も有する。したがって、軟骨以外の細胞を利用した、生体外での効率的な軟骨組織再生技術が望まれている。

発 明 の 開 示

本発明は、自家軟骨を侵襲することなく、3 次元的に軟骨組織を構築する技術を提供することを目的とする。

かかる課題を解決するために、本発明者らは鋭意検討した結果、自家軟骨の代わりに骨髓に含まれる間葉系幹細胞を利用し、これを軟骨細胞に分化増殖させることを考えた。この方法であれば、正常組織に侵襲を与えることなく、多くの軟骨細胞を得ることができる。さらに、RWV (Rotating Wall Vessel) バイオリアクターを用いて、擬微小重力環境下で培養することにより、大きな軟骨組織を特別な足場材料を利用することなく構築できることを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は擬微小重力環境下で骨髓細胞を 3 次元的に培養することにより、軟骨組織を構築する方法に関する。

前記方法において、擬微小重力環境は時間平均して地球の重力の 1/10～1/100 程度であることが好ましい。このような擬微小重力環境は、回転で生じる応力によって地球の重力を相殺することにより擬微小重力環境を地上で実現するバイオリアクターを用いて得ることができる。

5 前記バイオリアクターとしては、1 軸回転式バイオリアクターが望ましく、例えば RWV (Rotating Wall Vessel) バイオリアクターを挙げることができる。RWV (Rotating Wall Vessel) バイオリアクターを用いた場合の培養条件は、例えば、播種密度 $10^6 \sim 10^7 / \text{cm}^3$ 、回転速度 8.5～25rpm (直径 5cm ベッセル) 程度であるが、これに限定されるものではない。

10 また本発明の方法では、培養液中に、TGF- β 、デキサメタゾン等の軟骨分化誘導因子を添加することが好ましい。さらに、骨髓細胞はコンフルエントになるまで 2 次元培養した後、さらにサブカルチャーしてから、擬微小重力環境下での培養に供することが望ましい。

本発明の 1 つの実施形態として、患者から採取された骨髓細胞を用いる方法が挙げられる。患者から採取された骨髓細胞により構築される軟骨組織は、拒絶反応等の問題がないため、当該患者の軟骨欠損部の再生・修復に好適に用いることができる。

本発明によれば、自家軟骨を侵襲することなく、効率的に生体外で 3 次元構造をもった軟骨組織を構築することができる。

20

図面の簡単な説明

図 1 は、実施例 1 の実験プロトコルを説明した図である。

図 2 は、RWV のベッセル (上) と 15ml コニカルチューブを示す写真 (下) である。

25 図 3 は、実施例 1 によって構築された軟骨組織切片の染色像を示す写真である〔上段：ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、中段：アルシアンブルー染色、下段：サフラニン O 染色〕。

図 4 は、培養後に形成された組織塊を比較したものである〔左：RWV を用いた回転培養・TGF- β 添加、中：静置培養 (ペレット培養)・TGF- β 添加、
30 右：静置培養 (ペレット培養)・TGF- β 非添加 (10%FBS)〕。

図 5 は、RWV の回転速度変化を示すグラフである。

図 6 は、アルカリフォスファターゼ活性測定の結果を示すグラフである〔左：静置培養（ペレット培養）・TGF- β 添加、中：静置培養（ペレット培養）・TGF- β 非添加（10%FBS）、右：RWV を用いた回転培養・TGF- β 添加〕。

5 図 7 は、RT-PCR の結果（A: Collagen type II、B: Aggrecan）を示す〔グラフ中、左：静置培養（ペレット培養）・TGF- β 添加、右：RWV を用いた回転培養〕。

図 8 は、培養 4 週間後の軟骨組織の圧縮強度（左）と正常ウサギ関節軟骨組織の圧縮強度（右）を比較したグラフである。

10 図 9 は、培養組織（生体外で 2 週間培養）をウサギ膝関節全層欠損に移植して、4 週間後のマクロ所見（A: RWV で培養した軟骨組織: bar=10mm、B: 全層欠損: bar=5mm、C: 移殖直後所見、D: 移殖後 4 週間所見）を示す写真である。

図 10 は、移植部の硬度（左）と正常ウサギ関節軟骨組織の硬度（右）を比較したグラフである。

図 11 は、移植組織（移植部分を四角枠で示す）の HE 染色像（A: ウサギ関節軟骨組織、B: 移植組織）を示す写真である。

図 12 は、移植組織のサフラニン O 染色像（A: ウサギ関節軟骨組織、B: 移植組織）を示す写真である。

20 図 13 は、移植組織の免疫組織学染色像（A: ウサギ関節軟骨組織、B: 移植組織）を示す写真である。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願 2003-413758 号、および特願 2004-96686 号の明細書に記載された内容を包含する。

25

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について詳細に説明する。

1. 擬微小重力環境

本発明において、「擬微小重力環境」とは、宇宙空間等における微小重力
30 環境を模して人工的に作り出された微小重力（simulated microgravity）

環境を意味する。こうした擬微小重力環境は、例えば、回転で生じる応力によって地球の重力を相殺することにより実現される。すなわち、回転している物体は、地球の重力と応力のベクトル和で表される力を受けるため、その大きさと方向は時間により変化する。結局、時間平均すると物体には

5 地球の重力（ g ）よりもはるかに小さな重力しか作用しないこととなり、宇宙空間によく似た「擬微小重力環境」が実現される。

前記「擬微小重力環境」は、細胞が沈降することなく均一に分散した状態で増殖分化し、3次元的に凝集して、組織塊を形成できるような環境であることが必要となる。言い換えれば、播種細胞の沈降速度に同調するように回転速度を調節して、細胞に対する地球の重力の影響を最小化することが望まれる。具体的には、培養細胞にかかる微小重力は、時間平均して

10 地球の重力（ g ）の $1/10 \sim 1/100$ 程度であることが望ましい。

2. バイオリアクター

15 本発明では、擬微小重力環境を実現するために、回転式のバイオリアクターを使用する。そのようなバイオリアクターとしては、例えば、RWV（Rotating-Wall Vessel：US 5,002,890）、RCCS（Rotary Cell Culture SystemTM:Synthecon Incorporated）、3D-clinostat、ならびに特開平8-173143号、特開平9-37767号、および特開2002-451

20 73号に記載されているようなものを用いることができる。なかでも、RWVおよびRCCSはガス交換機能を備えているという点で優れている。また、1軸式と2軸式では、1軸式の回転式バイオリアクターのほうが好ましい。2軸式（例えば、2軸式のclinostat等）では、ずれ応力（シアストレス）を最小化することができず、またサンプル自体も回転するため、1軸

25 式のようにベッセル内にふわふわと浮かんだ状態を再現することができないからである。このふわふわと浮かんだ状態が、特別な足場材料なしに大きな3次元組織塊を得るための重要な条件となる。

本発明の実施例で用いられているRWVは、NASAによって開発されたガス交換機能を備えた1軸式の回転式バイオリアクターである。RWVは、横

30 き円筒形バイオリアクター内に培養液を満たし、細胞を播種した後、その

円筒の水平軸方向に沿って回転しながら培養を行う。バイオリアクター内には、回転による応力のため、実質的に地球の重力よりもはるかに小さい「微小重力環境」が実現される。この擬微小重力環境下において、細胞は培養液内に均一に懸濁され、最小のずり応力下で必要時間培養増殖され、凝集して組織塊を形成する。

RWV を用いた場合の好ましい回転速度は、ベッセルの直径および組織塊の大きさや質量に応じて適宜設定され、例えば直径 5cm のベッセルを用いた場合であれば 8.5~25rpm 程度であることが望ましい。このような回転速度で培養を行うとき、ベッセル内の細胞に作用する重力は実質的に地上の重力 (g) の 1/10~1/100 程度となる。

3. 骨髄細胞

本発明では軟骨組織構築の材料として骨髄細胞を用いる。本発明に用いられる骨髄細胞は、分化・増殖能力を有する未分化の細胞であり、特に骨髄由来の間葉系幹細胞が好ましい。前記細胞は、樹立された培養細胞株のほか、患者の生体から単離された骨髄細胞を好適に用いることができる。該細胞は患者から採取された後、常法に従って結合組織等を除去して調製することが好ましい。また、常法により一次培養を行い、予め増殖させてから用いてもよい。さらに患者から採取した培養は、凍結保存されたものであってもよい。つまり、予め採取した骨髄細胞を凍結保存しておき、必要に応じて利用することもできる。

4. 細胞の培養条件

細胞の分化増殖に用いられる培地としては、MEM培地、 α -MEM培地、DMEM培地等、骨髄細胞の培養に通常用いられる培地を、細胞の特性に合わせて適宜選んで用いることができる。また、該培地には、FBS (Sigma社製) や Antibiotic-Antimycotic (GIBCO BRL社製) 等の抗生物質等を添加しても良い。

さらに培養液中には、軟骨細胞分化促進作用を有する、デキサメタゾン、FK-506やシクロスポリン等の免疫抑制剤、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、

BMP-7及びBMP-9等の骨形成タンパク質（BMP: Bone Morphogenetic Proteins）、TGF- β 等の骨形成液性因子から選ばれる1種又は2種以上を、グリセリンリン酸、アスコルビン酸リン酸等のリン酸原とともに、添加してもよい。特に、TGF- β とデキサメタゾンのいずれかまたは両方を適当なリン酸原とともに添加することが好ましい。この場合、TGF- β は1ng/ml～10ng/ml程度、デキサメタゾンは100nMを上限として加えられる。

細胞の培養は、3～10%CO₂、30～40℃、特に5%CO₂、37℃の条件下で行うことが望ましい。培養期間は、特に限定されないが、少なくとも7日、好ましくは21～28日である。

特に、RWV（直径5cmベッセル）を使用する場合、骨髓細胞を10⁶～10⁷/cm³の播種密度で播種し、8.5～25rpmの回転速度（直径5cmのベッセル）で培養を行うとよい。この条件であれば、播種細胞の沈降速度とベッセルの回転速度が同調し、細胞に対する地球の重力の影響が最小化されるからである。なお、オーバーコンフルエントにまで2次元培養した細胞をサブカルチャーした後、RWVで培養すると大きな組織塊が得られる。

5. 本発明の利用

本発明の方法を再生医療に応用すれば、自己の骨髓細胞を利用した軟骨組織の再生が可能になる。すなわち、患者から採取した骨髓細胞を擬微小重力下で3次的に培養して、軟骨組織を構築し、該患者の軟骨欠損部に適用する。構築された軟骨組織は拒絶反応の危険性がないうえ、自家軟骨の使用に比較して正常組織の侵襲が少ないため、より安全な軟骨再生を可能にする。

25 実施例

実施例1：ウサギ骨髓由来間葉系幹細胞からの軟骨組織構築

1. ウサギ骨髓由来間葉系幹細胞の培養

（1）ウサギ骨髓由来間葉系幹細胞の調製

ウサギ骨髓由来間葉系幹細胞は、2週齢のJW系家兎（雌）の大腿骨より Maniatopoulosらの方法（Maniatopoulos, C., Sodek, J., and Melcher, A.

H. (1988) Cell Tissue Res. 254, p317-330) に従って採取した。採取した細胞を、10% FBS (Sigma社製) およびAntibiotic-Antimycotic (GIBCO BRL社製) を含むDMEMで3週間にわたって培養し、増殖させた。

(2) ウサギ骨髄由来間葉系幹細胞の培養

- 5 上記のようにして調製したウサギ骨髄由来間葉系幹細胞を、 10^{-7} M Dexamethasone (Sigma社製)、10ng/ml TGF- β 3 (Sigma社製)、50 μ g/ml アスコルビン酸 (Wako製)、ITS+Premix (BD製)、40 μ g/ml L-proline (Sigma社製) およびAntibiotic-Antimycotic (GIBCO BRL社製) を含むDMEM培養液 (Sigma社製) 10mlに、 1×10^6 cells/mlとなるように懸濁し、4週間にわた
- 10 って静置培養 (ペレット培養) もしくはRWVバイオリアクター (Synthecon社製) による回転培養を行なった。

- 静置培養は、15ml コニカルチューブに上記細胞懸濁液 10ml を入れ、50g で5分間遠心して作製したペレット組織を、37℃、5%CO₂ 条件下でペレット培養した。また、TGF- β を添加しない条件下でも同様にしてペレット培養
- 15 を行った。一方、RWV バイオリアクターによる回転培養は、直径 5cm のベッセルを用いて、回転数: 8.0~24rpm、37℃、5%CO₂ の条件下で行った。回転数は、目視で組織塊が液中に浮いている状態になるように頻繁に調整した (RWV の回転速度変化を図5に示す)。また、細胞の呼吸により泡が生じるが、これは擬微小重力環境を乱すことから頻繁に除去した。図1に本実施例のプロトコルを、また図2にRWVのベッセルと、15ml コニカルチューブの写真を示す。また、培養後の組織塊を比較した結果を図4に示す。図4は左から、TGF- β を添加して行ったRWVを用いた回転培養、TGF- β を添加して行った静置培養 (ペレット培養)、TGF- β を添加せずに行った静置培養 (ペレット培養) の結果を示す。
- 20

25 2. 培養組織の評価方法

(1) 組織染色

- 静置培養 (ペレット培養) および回転培養で得られたそれぞれの軟骨組織は、1週間ごとにヘマトキシリン・エオジン (HE)、サフラニンOおよびアルシアンブルーで組織染色を行い、軟骨基質産生能を評価した。まず、
- 30 培養組織は、4%パラホルムアルデヒド、0.1%グルタルアルデヒドでマイクロ

ウェーブ固定した後、翌日 10%EDTA, 100mM Tris (pH7.4) 中で約 1 週間脱灰した。脱灰後、エタノールで脱水し、パラフィンに包埋した。5 μ m の厚さで切片を作製した。次いで、各切片について脱パラフィン後、常法にしたがい、ヘマトキシリン・エオジン、サフラニンO、およびアルシアンブルー染色を行った。結果を図 3 に示す。

(2) アルカリフォスファターゼ活性

静置培養（ペレット培養）および回転培養で得られたそれぞれの軟骨組織について、1 週間ごとにアルカリフォスファターゼ（ALP）活性測定を行った。ALP 活性の測定は、培養組織を 100 mM Tris (pH 7.5), 5mM $MgCl_2$ で洗浄後、スクレイパーで集め、500 μ l の 100 mM Tris (pH 7.5), 5mM $MgCl_2$, 1% Triton X-100 に懸濁して超音波破碎した。破碎後 6,000g で 5 分間遠心して上清を回収した。酵素活性は、0.056 M 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol (pH 9.9), 10 mM p-nitrophenyl phosphate, 2 mM $MgCl_2$ に各上清 5 μ l を加え、37℃で 30 分間インキュベートした後、すぐにマイクロプレートリーダーで吸収波長 405 nm の吸光度を測定して求めた。検量線は p-nitrophenol を用いて作製した。結果を図 6 に示す。グラフ中、「RWV」は RWV を用いた回転培養、「TGF- β 」は TGF- β を添加して行ったペレット培養、10%FBS は TGF- β を添加せずに行ったペレット培養の結果を示す。

(3) 定量的 RT-PCR

静置培養（ペレット培養）および回転培養で得られたそれぞれの軟骨組織について、1 週間毎に軟骨特異的遺伝子である collagen Type II や Aggrecan の発現量を定量的 RT-PCR により測定した。

培養組織からの RNA の抽出は、TRIzol Reagent (Invitrogen) を用いた。方法はプロトコールに従い、組織を TRIzol 中で溶解したのち、200 μ l のクロロホルムを添加、よく振り混ぜて 15000rpm で遠心。イソプロパノール沈澱、エタノール沈澱の後、DEPC 水に溶解し、吸光度測定により濃度を計算し、約 1 μ g の totalRNA を RT に供した。

RT は、キット First-Strand cDNA Synthesis Using SuperScript III for RT-PCR (Invitrogen) および TAKARA RNA PCR kit (AMV) Ver. 2.1 (TaKaRa) を

使用して実施した。First-Strand cDNA Synthesis Using SuperScript III for RT-PCR は、50℃ 60 分、70℃ 15 分の条件で RT 反応を行なった。TAKARA RNA PCR kit (AMV) Ver. 2.1 (TaKaRa) は、30℃ 10 分、42℃ 30 分、99℃ 5 分、5℃ 5 分の条件で RT 反応を行なった。RT で用いたプライマーは以下のとおりである。

[RT プライマー]

Aggrecan: 5' -cctaccaggacaaggtctcg-3' (配列番号 1)

Collagen type II: 5' -ccatcattgacattgcacccatgg-3' (配列番号 2)

リアルタイム PCR は、FastStartDNA Master CYBR Green I キット、PCR 装置として Light Cycler (Roche) を使用し、以下のプライマーと反応条件で実施した。

[PCR プライマー]

Aggrecan Forward: 5' -cctaccaggacaaggtctcg-3' (配列番号 3)

Aggrecan Reverse: 5' -gtagcctcgctgtcctcaag-3' (配列番号 4)

Collagen type II Forward: 5' -ccatcattgacattgcacccatgg-3' (配列番号 5)

Collagen type II Reverse: 5' -gttagtttcctgtctctgccttg-3' (配列番号 6)

[PCR 反応条件]

Denature: 95℃ 5 秒 1 サイクル

Amplification: 95℃ 15 秒、60℃ 5 秒、72℃ 15 秒 40 サイクル

Melting curve: 70℃ 10 秒

Cooling: 40℃ 30 秒

RT-PCR の結果を図 7 に示す (A: Collagen type II、B: Aggrecan)。グラフの「RWV」は RWV を用いた回転培養、「TGF- β 」は TGF- β を添加して行ったペレット培養の結果を示す。

3. 結果

3 週間後、静置培養 (ペレット培養) では細胞が沈降しているが凝集が弱く、組織は直径 5mm 程度であった。これに対し、RWV バイオリアクターによる回転培養では細胞同士が擬微小重力下で凝集し、直径 1cm~1.5cm

- 程度の三次元組織が形成された。この三次元組織はサフラニンOおよびアルシアンブルーで染色され、軟骨基質産生能を持つことが示された。また、定量的 RT-PCR の結果から Collagen Type II や Aggrecan の発現が確認された。以上の結果から、骨髓由来間葉系幹細胞から RWV バイオリアクターを用いて軟骨三次元組織を再生することができることが確認された。

さらに、RWV を用いた最適培養条件を検討したところ、オーバーコンフルエントにまで 2 次元培養した細胞をサブカルチャーした後、RWV で培養すると大きな組織塊が得られることがわかった。

10 実施例 2 : RWV 培養組織の強度測定

RWV 培養組織の強度を EIKO TA-XT2i (EKO INSTRUMENTS 社製) を使用して測定した。実施例 1 に従って作製した RWV 培養組織を 2mm 角に成形し、0.1mm/sec の速度で圧縮した。その負荷 (Pa) と距離 (mm) に基づく stress-strain 曲線から、強度を計測した。

- 15 図 8 に、培養 4 週間後の軟骨組織の圧縮強度を、正常ウサギ関節軟骨組織のそれと比較した結果を示す。

実施例 3 : RWV 培養組織のウサギ膝関節全層欠損部移植実験

1. ウサギ膝関節全層欠損部への移植

- 20 実施例 1 に従って作製した RWV 培養組織 (生体外で 2 週間培養) をウサギ膝関節全層欠損部に移植し、移植部の硬度と組織所見について評価した。

- ウサギはソムノペンチル 0.6mg/kg を用いて静脈麻酔酔した。手術部位は、左大腿骨顆部 (左膝関節) 荷重部とした。膝蓋骨外側に縦皮切を入れ、関節包を内側傍膝蓋骨アプローチにより切開した。膝蓋骨を外側に翻転して脱臼させた後、大腿骨滑車部に径 5mm のドリルを用いて深さ 4mm の軟骨全層欠損を作成した (底面は先が平らなドリルを用いて平滑に整え、辺縁は円刃でトリミングした)。軟骨塊を皮抜きポンチを用いて径 5mm に成形し、欠損部に移植した。膝蓋骨を整復し、関節包、皮膚を 4-0 ナイロンで縫合、膝関節屈曲進展にて膝蓋骨が脱臼しないことを確認して手術を終了した。
- 30 た。

2. 移植組織の硬度

移植組織の硬度は、計測部位にプローブをあて、Venus Rod (Axiom 社製) を用いて周波数の変化を計測することにより測定した。図 10 に、移植部 (左) と正常ウサギ関節軟骨組織 (右) の硬度測定の結果を示す。

5 3. 組織所見

移植組織は、マクロ所見に加えて、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色)、サフラニン 0 染色 (S0 染色)、免疫組織学的染色により評価した。

図 9 に、移植 4 週間後の RWV 培養組織の写真 (A: RWV で培養した軟骨組織: bar=10mm、B: 全層欠損: bar=5mm、C: 移植直後所見、D: 移植後 4 週間所見) を示す。また、図 11 ~ 13 に、移植組織の HE 染色、S0 染色、免疫組織学染色の結果 (A: ウサギ関節軟骨組織、B: 移植組織) をそれぞれ示す。

4 週間 RWV を用いた回転培養をした結果、長径 15mm の軟骨組織を構築できた (図 9 (A))、全層欠損モデルに移植後 4 週間たった欠損箇所の組織所見 (図 9 (B), (C)) は、きわめて滑らかな表面が観察でき、良好な軟骨再生が実現したと考えられた。4 週後の組織切片の HE 染色像では、正常軟骨組織と同様の軟骨再生像を観察することができた (図 11)。軟骨の基質を特異的に染色するサフラニン 0 染色像でも、正常軟骨組織と類似の染色像が得られ、軟骨基質を産生しつつ再生されたことを確認した (図 12)。また、軟骨に特異的な II 型コラーゲンの発現も確認できた。

20

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

25 本発明によれば、自家軟骨を侵襲することなく、骨髄細胞から効率的に軟骨組織を構築することができる。本発明の方法は、基礎研究はもとより、軟骨欠損部の修復を目的とした再生医療に利用することができる。

配列表フリーテキスト

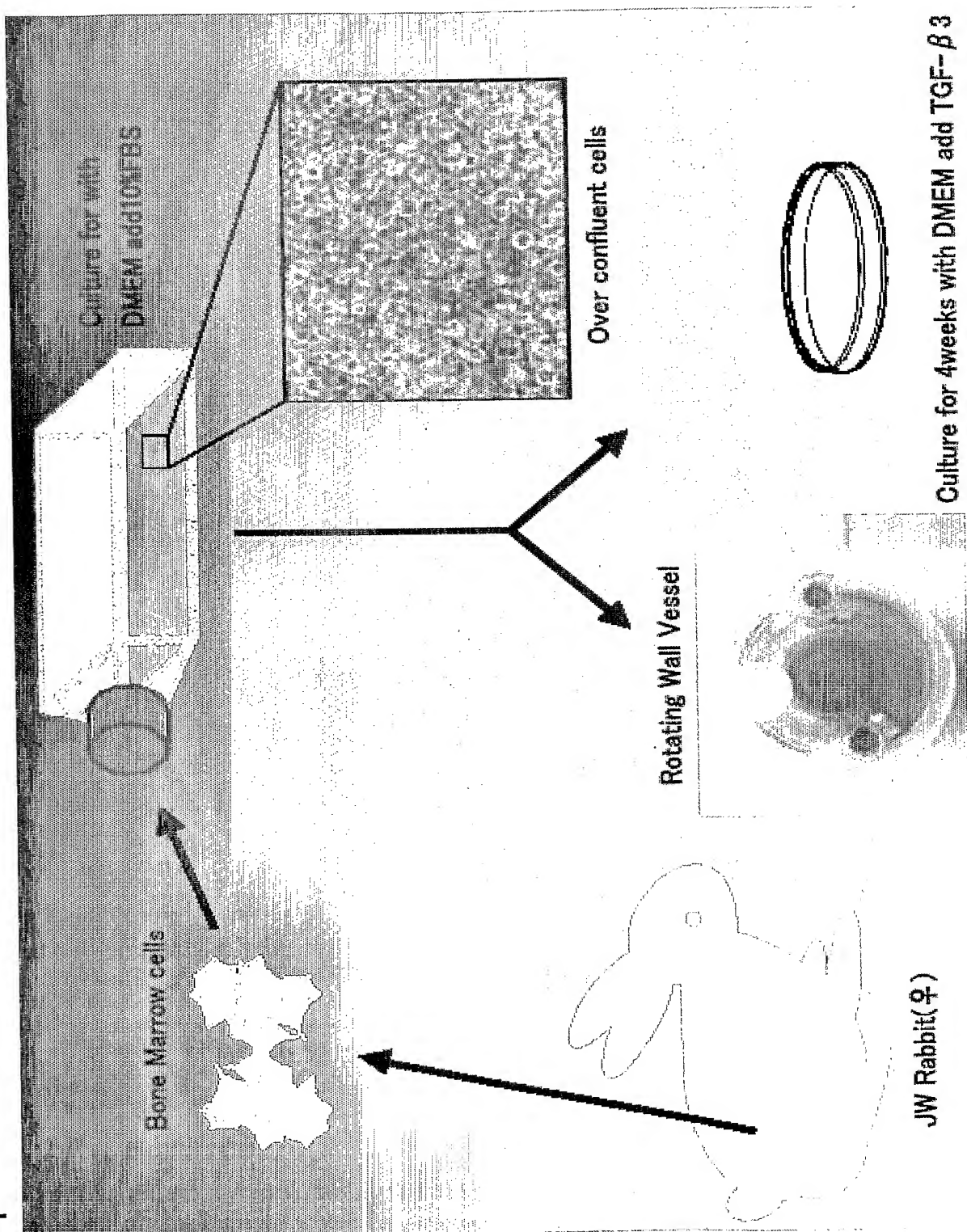
30 配列番号 1 - 人工配列の説明: 合成 DNA (プライマー)

- 配列番号 2 ー人工配列の説明：合成 DNA（プライマー）
配列番号 3 ー人工配列の説明：合成 DNA（プライマー）
配列番号 4 ー人工配列の説明：合成 DNA（プライマー）
配列番号 5 ー人工配列の説明：合成 DNA（プライマー）
5 配列番号 6 ー人工配列の説明：合成 DNA（プライマー）

請 求 の 範 囲

1. 擬微小重力環境下で骨髄細胞を3次元的に培養することにより、軟骨組織を構築する方法。
- 5 2. 前記擬微小重力環境が、時間平均して地球の重力の1/10～1/100に相当する重力を物体に与える環境である、請求項1に記載の方法。
3. 前記擬微小重力環境が、回転で生じる応力によって地球の重力を相殺することにより擬微小重力環境を地上で実現するバイオリアクターを用いて得られるものである、請求項1または2に記載の方法。
- 10 4. 前記擬微小重力を地上で実現するバイオリアクターが、1軸回転式バイオリアクターである、請求項3に記載の方法。
5. 前記擬微小重力を地上で実現するバイオリアクターが、RWV (Rotating Wall Vessel) バイオリアクターである、請求項4に記載の方法。
6. 骨髄細胞の播種密度が $10^6 \sim 10^7/\text{cm}^3$ 、RWVの回転速度が直径5cmベッセルに対して8.5～25rpmの条件下で培養が行われる、請求項5に記載の方法。
- 15 7. 培養液中にTGF- β および／またはデキサメタゾンを追加して培養が行われる、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。
8. コンフルエントになるまで2次元培養した後、さらにサブカルチャーした骨髄細胞を擬微小重力環境下で培養する、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。
- 20 9. 前記骨髄細胞が患者から採取された細胞である、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

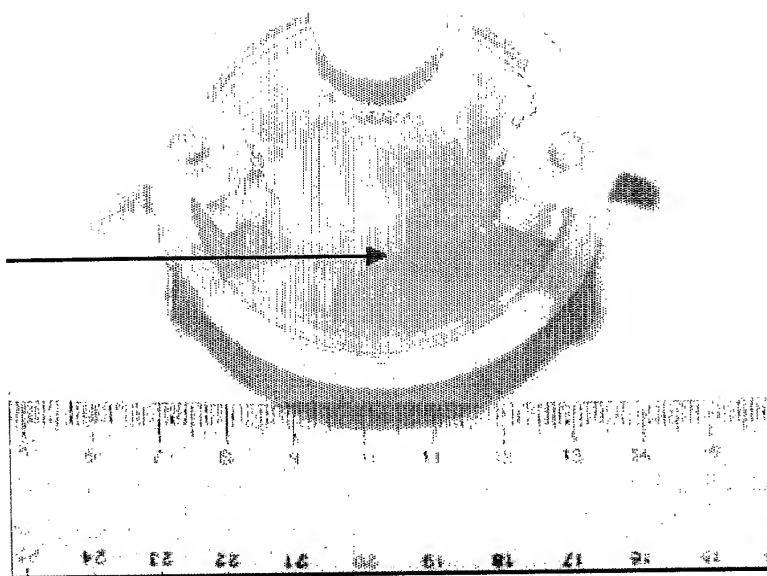
1



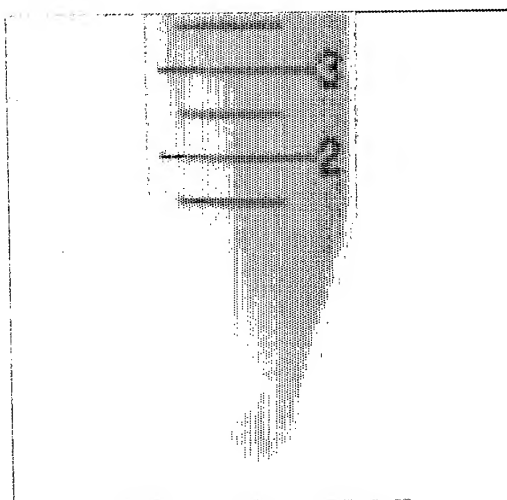
Culture for 4 weeks with DMEM add TGF- β 3

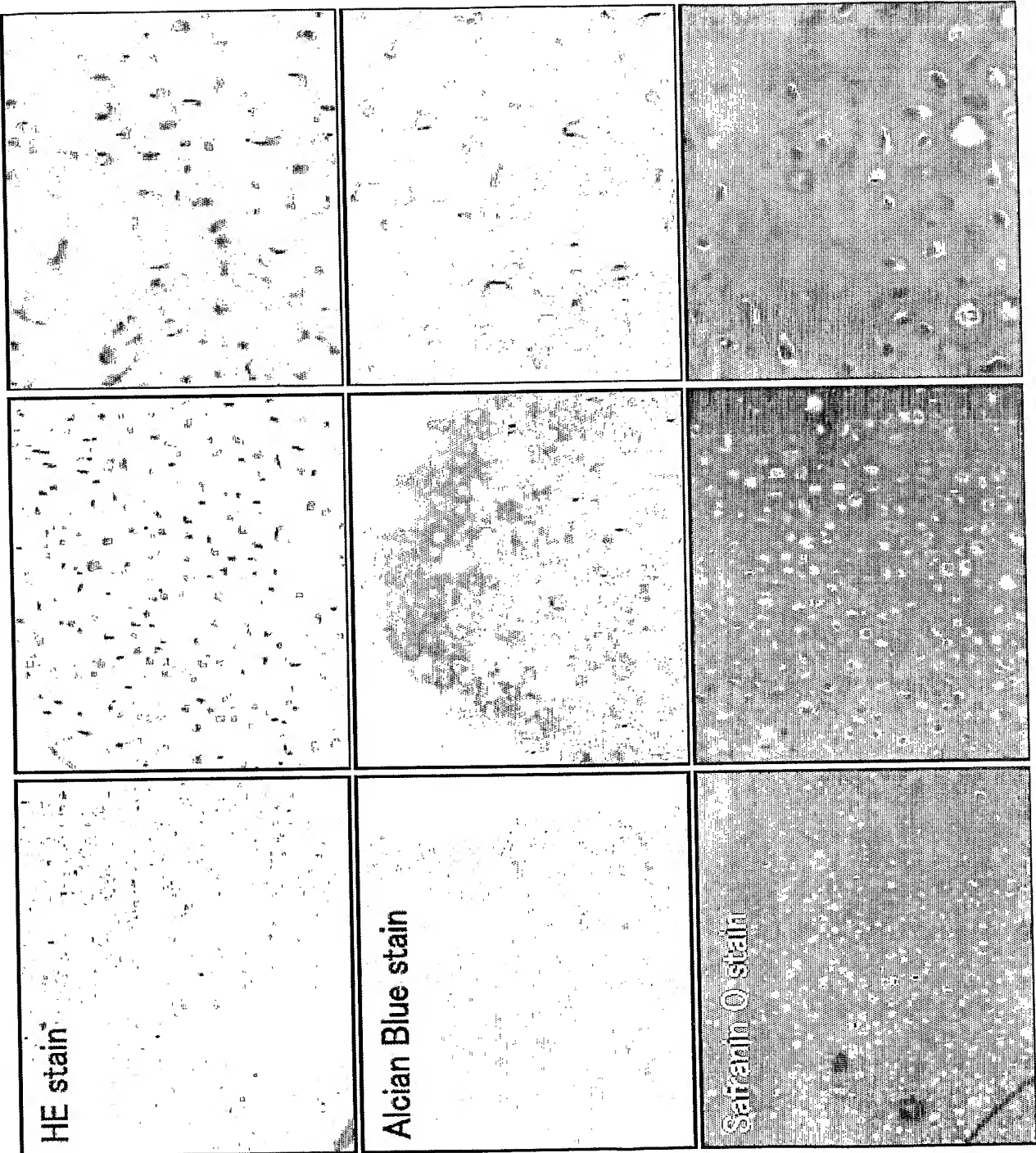
図 2

A



B





3

図 4

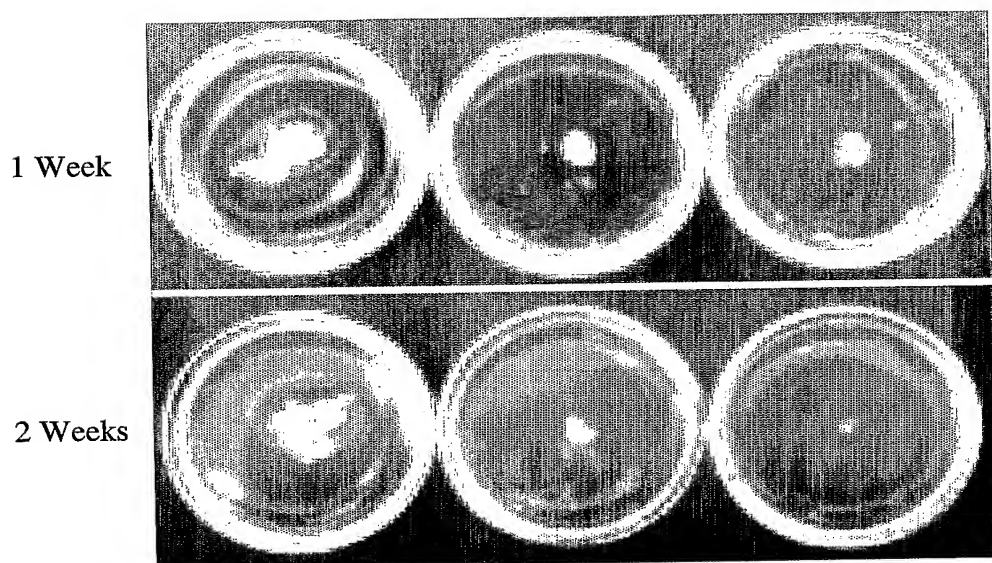


図 5

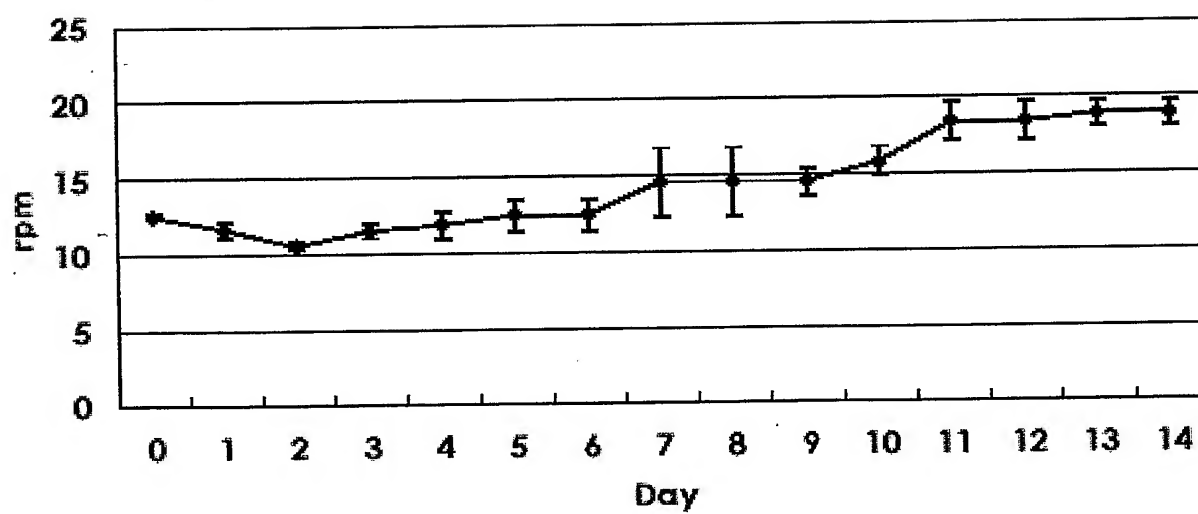
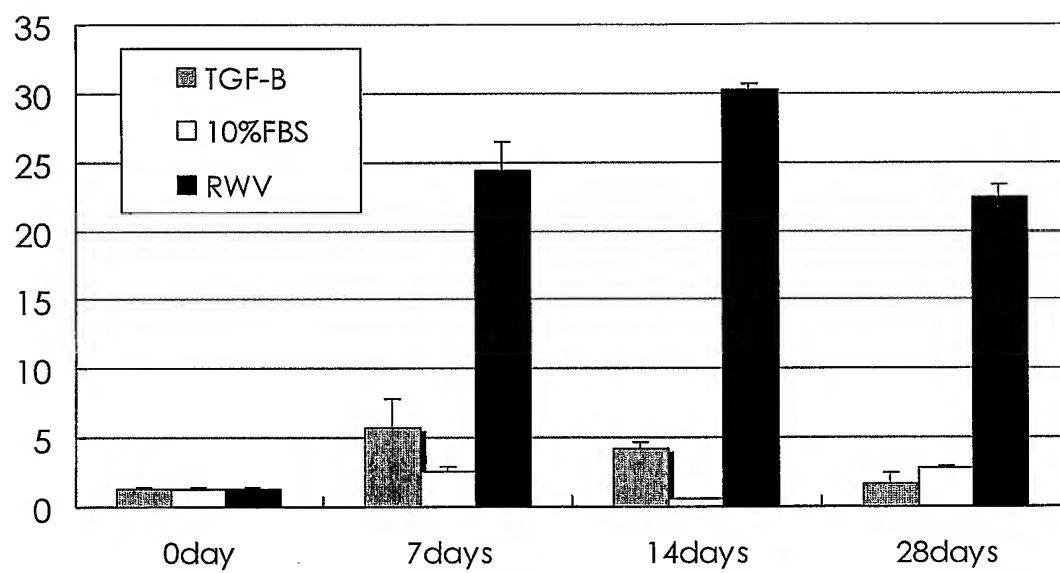


図 6



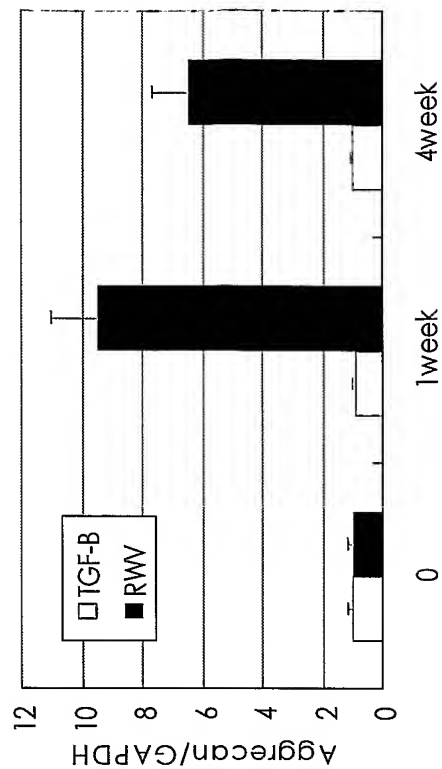
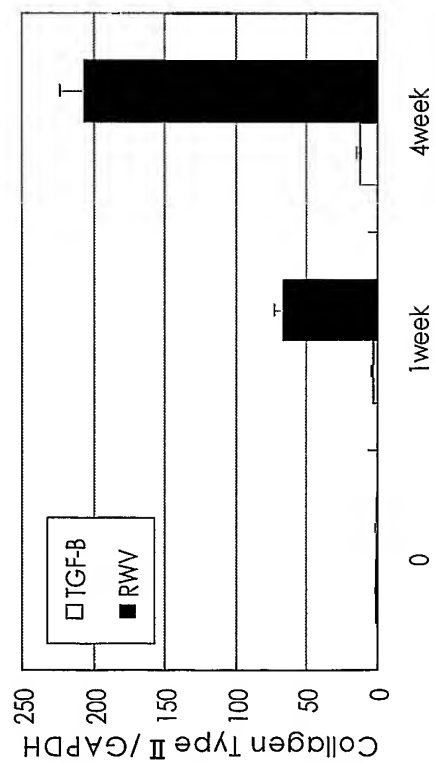
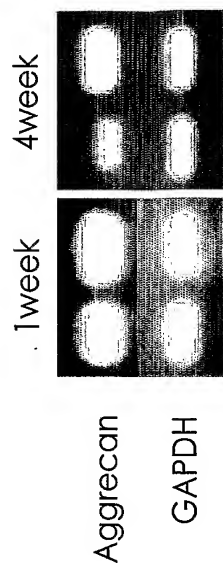
* $P < 0.05$

図 7

A



B



* $P < 0.01$, ** $P < 0.05$

図 8

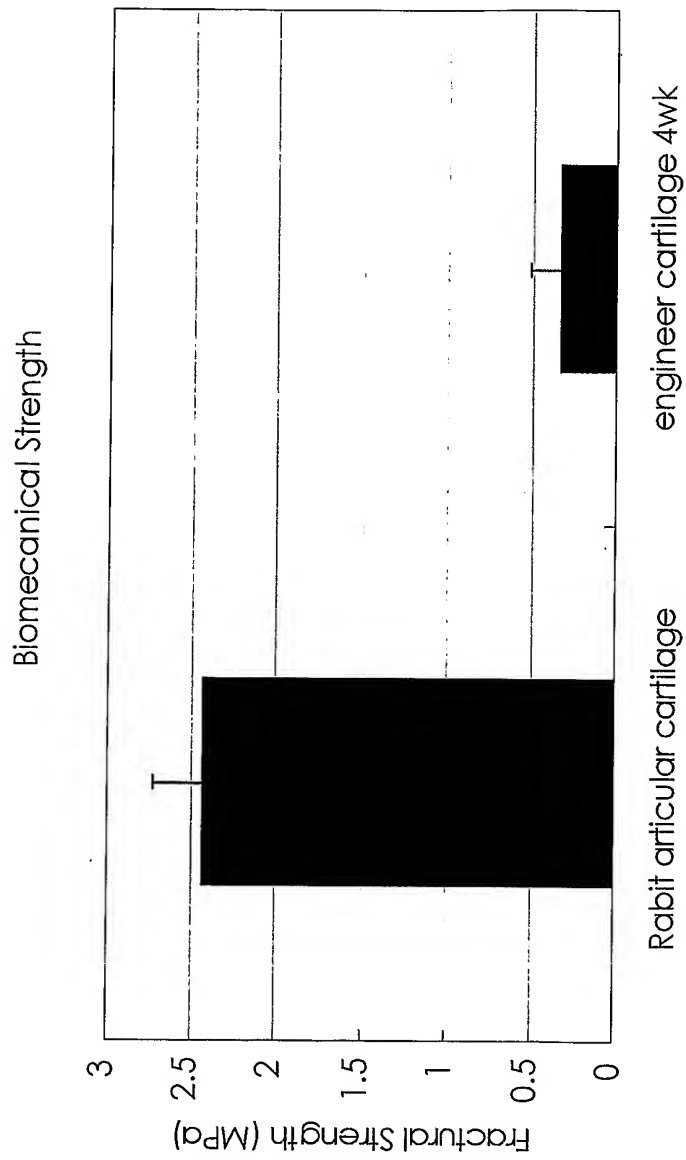
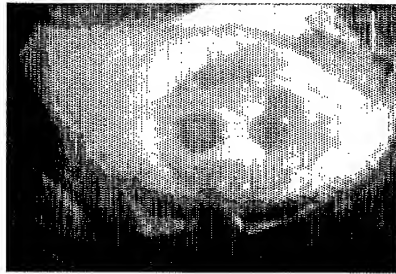


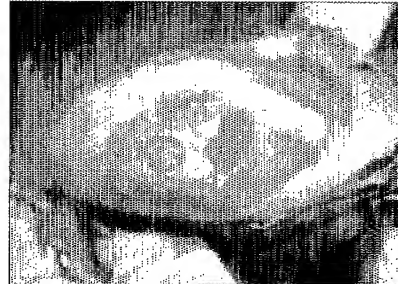
図 9



A



B



C



D

図 10

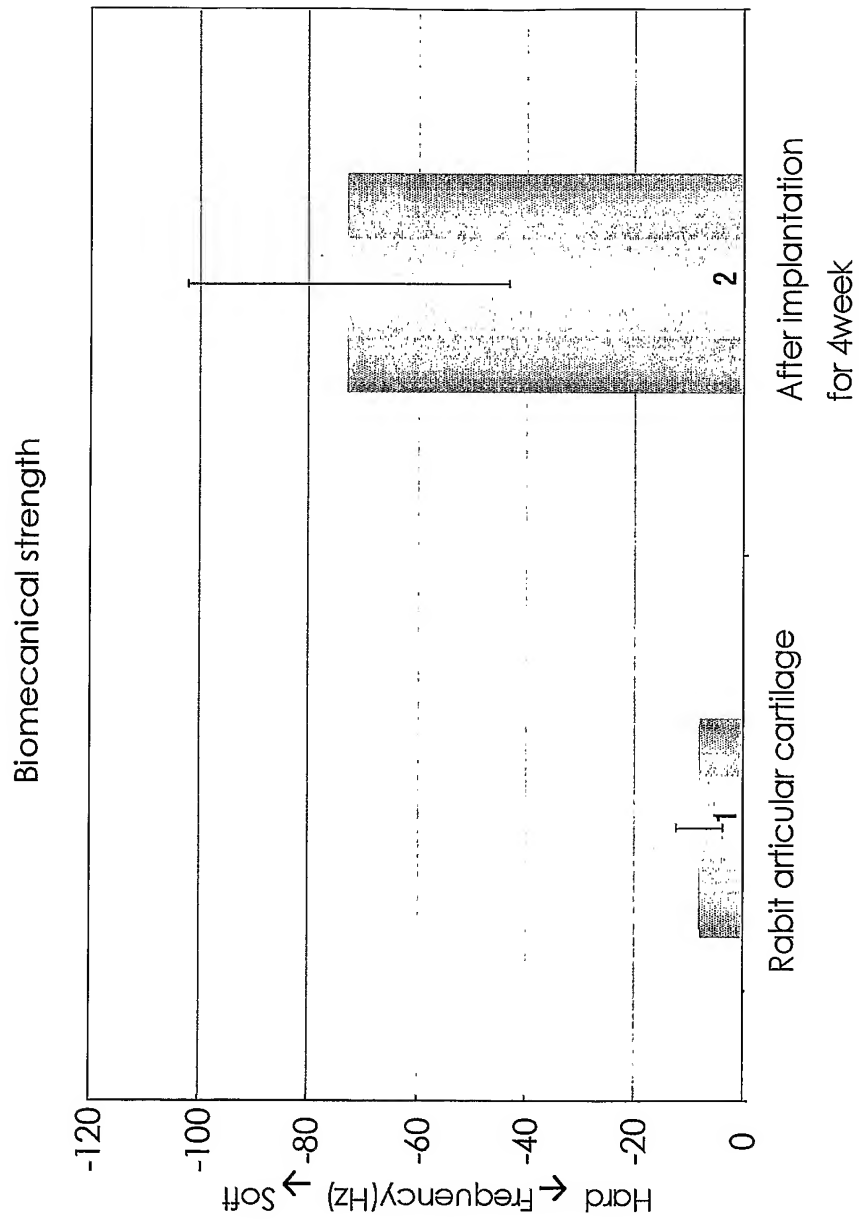
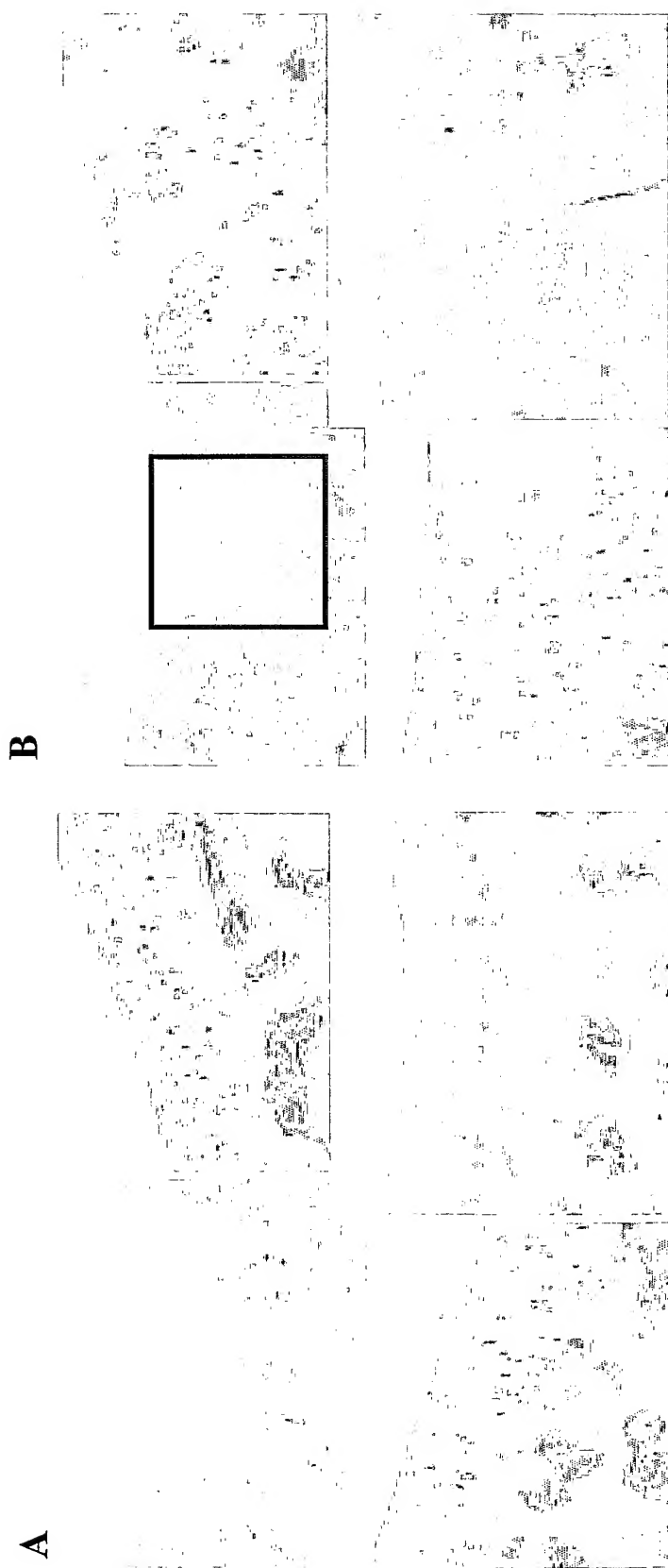


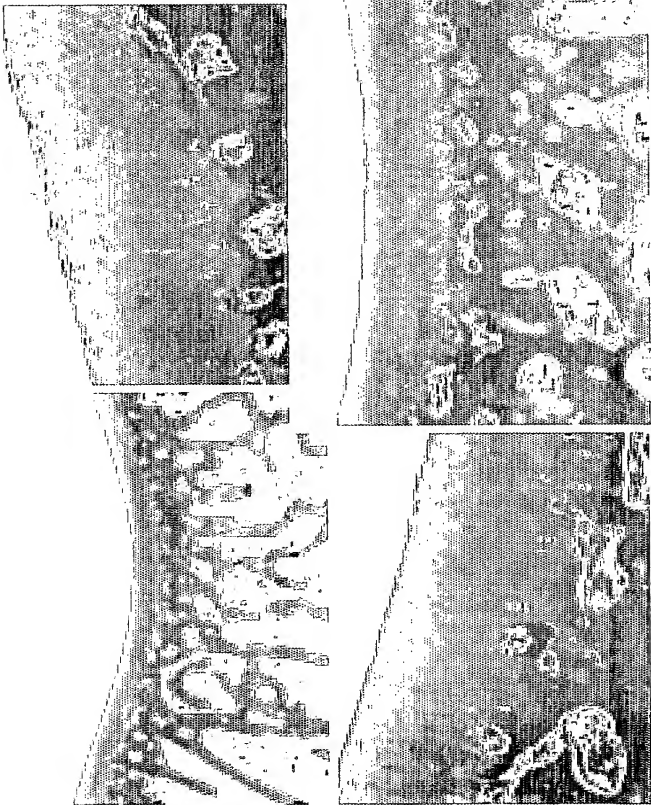
図 11



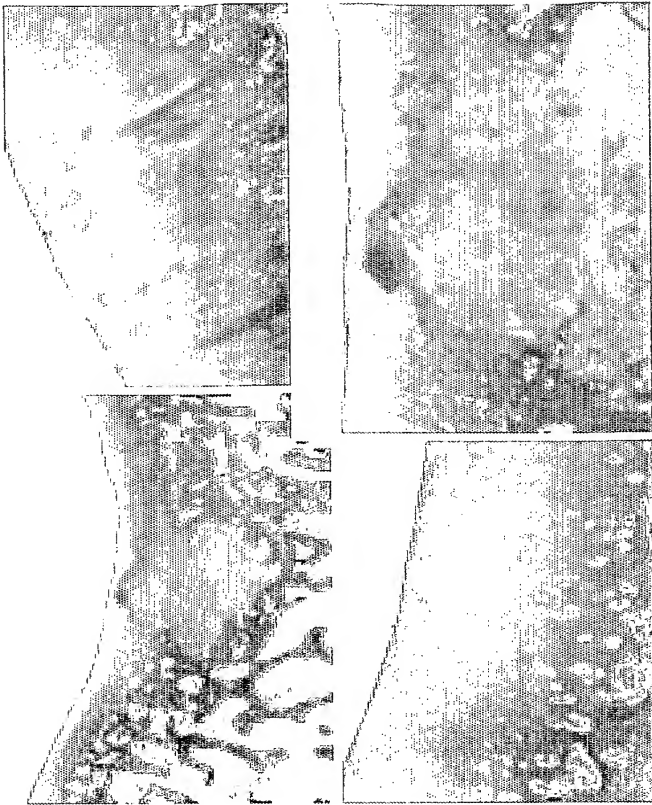
HE stain

図 12

A

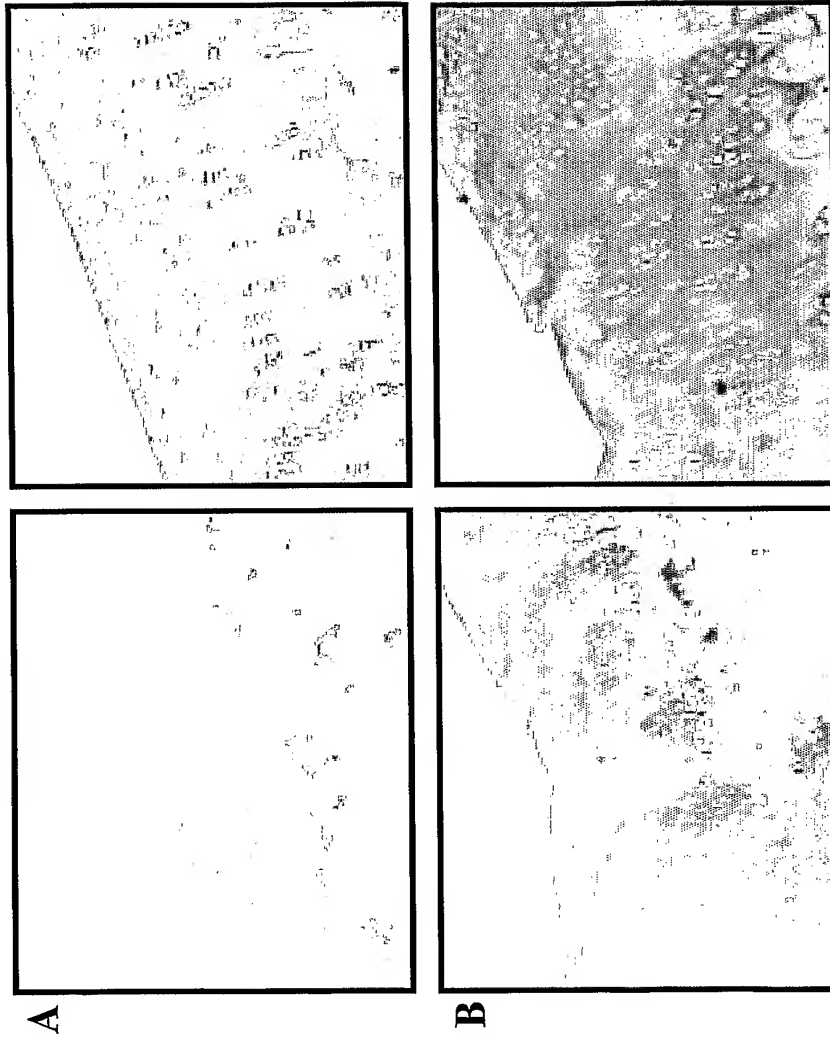


B



SO stain

図 13



免疫組織学染色 / TypeII Collagen

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
National Institute for Materials Science

<120> Three-dimensional cartilage tissue generation from chondrocyte under simulated microgravity

<130> PH-2347-PCT

<140>
<141>

<150>JP2003-413758
<151>2003-12-11

<150>JP2004-096686
<151>2004-03-29

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA (primer)

<400> 1
cctaccagga caaggtctcg 20

<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA (primer)

<400> 2
ccatcattga cattgcaccc atgg 24

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA (primer)

<400> 3
cctaccagga caaggtctcg 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA (primer)

<400> 4
gtagcctcgc tgcctcaag 20

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA (primer)

<400> 5
ccatcattga cattgcaccc atgg 24

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA (primer)

<400> 6

gttagtttcc tgtctctgcc ttg

23

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)) 氏名(姓名)	本国際出願 に関し、 独立行政法人科学技術振興機構 は、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のよう に開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1(i)	開示の種類:	刊行物
VIII-5-1(ii)	開示の日付:	2003年 12月 03日 (03.12.2003)
VIII-5-1(iii)	開示の名称:	CREST平成15年度シンポジウム「分子複合系の構築と 機能」講演要旨集 P. 160
VIII-5-1(iv)	開示の場所:	
VIII-5-1(i)	開示の種類:	刊行物
VIII-5-1(ii)	開示の日付:	2003年 12月 16日 (16.12.2003)
VIII-5-1(iii)	開示の名称:	第25回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 P. 271
VIII-5-1(iv)	開示の場所:	
VIII-5-1(v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	すべての指定国

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018339

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A61L27/38, C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ A61L27/38, C12N5/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1926-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-512304 A (Osiris Therapeutics, Inc.), 21 August, 2001 (21.08.01), Claim 13 & AU 9855911 A & CA 2274122 C & EP 948255 A1 & US 2003/026786 A1 & WO 98/32333 A1	1-9
Y	MARLOVITS, S. et al., Tissue engineering of human articular cartilage in rotating-wall vessels, International Journal of Artificial Organs, 2002, Vol.25, No.7, page 676	1-9
Y	MARLOVITS, S. et al., Three-dimensional culture of human articular chondrocytes in rotating-wall vessels, FASEB Journal, 1999, Vol.13, No.4, PART 1, page A427	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 February, 2005 (07.02.05)

Date of mailing of the international search report
22 February, 2005 (22.02.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018339

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PREWETT, T.L. et al., Three-dimensional culture of bovine chondrocytes in rotating-wall vessels, In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal, 1994, Vol.30A, No.3, PART 2, page 109	1-9
Y	FREED, L.E. et al., Microgravity tissue engineering, In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal, 1994, Vol.33, No.5, pages 381 to 385	1-9
Y	JP 2003-009852 A (Mitsubishi Heavy Industries, Ltd.), 14 January, 2003 (14.01.03), Par Nos. [0016], [0019] (Family: none)	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61L27/38, C12N5/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61L27/38, C12N5/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1926-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2001-512304 A (オシリス セラピューティクス, インコーポレイテッド) 2001.08.21, 請求項13参照 & AU 9855911 A & CA 2274122 C & EP 948255 A1 & US 2003/026786 A1 & WO 98/32333 A1	1-9
Y	MARLOVITS, S. et al, Tissue engineering of human articular cartilage in rotating-wall vessels, International Journal of Artificial Organs, 2002, Volume 25; Number 7, pp. 676	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.02.2005

国際調査報告の発送日

22.2.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

安川 聡

4C

3039

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2004年1月)